

17 DEC 2004

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 12 月 24 日 (24.12.2003)

PCT

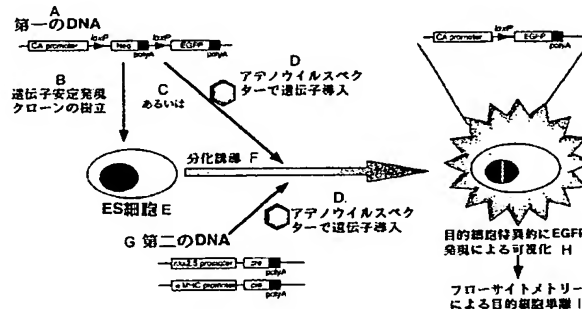
(10) 国際公開番号
WO 03/106673 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/00, 5/06, C12Q 1/04 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP03/07536 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小財 健一郎
(22) 国際出願日: 2003 年 6 月 13 日 (13.06.2003) (KOSAI, Kenichiro) [JP/JP]; 〒500-8705 岐阜県 岐阜市
(25) 国際出願の言語: 日本語 司町 4 0 番地 岐阜大学医学部内 Gifu (JP). 高橋 知之
(26) 国際公開の言語: 日本語 (TAKAHASHI, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒500-8705 岐阜県
(30) 優先権データ: 特願2002-175231 2002 年 6 月 17 日 (17.06.2002) JP 岐阜市 司町 4 0 番地 岐阜大学医学部内 Gifu (JP).
(74) 代理人: 西尾 章 (NISHIO, Akira); 〒501-1203 岐阜県
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人名古屋産業科学研究所 (NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒460-0008 愛知県 名古屋市中区 栄二丁目 1 0 番 1 9 号 本巣郡本巣町 文殊 5 7-1 2 2 Gifu (JP).
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF SLECTIVE ISOLATION OR VISUALIZATION OF TARGET CELLS DIFFERENTIATED FROM EMBRYONIC STEM CELLS OR KIT FOR VISUALIZATION

(54) 発明の名称: 胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法及び単離又は可視化用キット



A...FIRST DNA
B...ESTABLISHMENT OF CLONE WITH STABLE GENE EXPRESSION
C...OR
D...GENE TRANSFER USING ADENOVIRUS VECTOR
E...ES CELL
F...INDUCING DIFFERENTIATION
G...SECOND DNA
H...VISUALIZATION BY EXPRESSING EGFP SPECIFICALLY TO
TARGET CELL
I...ISOLATION OF TARGET CELL BY FLOW CYTOMETRY

(57) Abstract: A method of the selective isolation or visualization of target cells differentiated from embryonic stem cells comprising transferring, into the embryonic stem cells, a first recombinant DNA, which has a first promoter, a gene carrying recombinase-recognition sequences at the both ends and a selection marker gene for the target cells differentiated from the embryonic stem cells located in this order in the 5' -side and in

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY



(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

which the selection marker gene is expressed by the first promoter, and a second recombinant DNA which has a second promoter expressed specifically to the target cells differentiated from the embryonic stem cells and a gene expressing recombinase located in this order in the 5' -side; and a kit for isolation or visualization which comprises a first gene transfer vector containing the first recombinant DNA and a second gene transfer vector containing the second recombinant DNA.

(57) 要約: 第1のプロモーター、リコンビナーゼ認識配列を両端に有する遺伝子、胚性幹細胞から分化する目的細胞の選択マーカー遺伝子の順に5'側から配置され、第1のプロモーターが選択マーカー遺伝子を発現させる第1の組換えDNAと、胚性幹細胞から分化する目的細胞に対して特異的に発現する第2のプロモーター、リコンビナーゼ発現遺伝子の順に5'側から配置された第2の組換えDNAとを、各々胚性幹細胞に導入する胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。第1のDNAを含む第1の遺伝子導入用ベクターと第2のDNAを含む第2の遺伝子導入用ベクターとを備えた単離又は可視化用キット。

明細書

胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法及び単離
又は可視化用キット

5 技術分野

本発明は、胚性幹細胞から分化した目的細胞を効率良く確実に選別して単離又は可視化できる方法及びこれに用いる単離又は可視化用キットに関する。

10 背景技術

胚性幹 (Embryonic Stem、ES) 細胞 (以下、ES細胞ともいう) は、初期胚から分離された細胞で、培養系を操作することにより血球系、心筋、骨格筋、神経などいかなる臓器、細胞にも分化し得る全能性を有するため、これを利用して発生学などの生物学、先端医学の分野などでの研究
15 の進展が大いに期待されている。このような研究のためには、ES細胞から分化した目的細胞を効率良く、確実に選別し、単離する方法の確立が最も重要な課題の一つである。

ところで、従来、分化した目的細胞が特異的な膜蛋白を発現する場合は、その膜蛋白を指標にフローサイトメトリーで目的の細胞を単離する
20 ことが行われている (守田陽平, リンパ球サブセットに対する多重染色解析: 中内啓光監修, 田中弥生編, フローサイトメトリー自由自在 (細胞工学 別冊), 秀潤社, p60-66 (1999) / Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S. Flkl-positive cells derived from embryonic stem
25 cells serve as vascular progenitors. Nature 408(6808): p92-6 (2000))。

しかし、この方法が適応できるのは、細胞特異的な分子が膜蛋白とし

て細胞外に発現している場合に限られるため、血球系や血管系などの一部の細胞、臓器に応用が限定されるのが実情であった。

このため心筋細胞のように特異的な膜蛋白が知られていない多くの細胞に対する方策としては、目的の細胞に特異的に発現する分子（遺伝子）
5 のプロモーター領域下にマーカー遺伝子をつないだ組換え遺伝子をES細胞に安定導入し、分化した細胞で特異的に発現するそのマーカーを指標に細胞を選別し、単離する方法が報告されている（Andressen C, Stocker E, Klinz FJ, Lenka N, Hescheler J, Fleischmann B, Arnhold S, Addicks K. Nestin-specific green fluorescent protein
10 expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation. Stem Cells 19(5):419-24 (2001)）。この方法は、組織特異的に発現する遺伝子のプロモーターを使うことにより、薬剤耐性遺伝子を細胞特異的に発現させてその薬剤を用いて目的細胞のみを選別する方法、あるいは特異的な波長の励起光で発色する分子を細胞
15 特異的に発現させることによりフローサイトメトリーで目的の細胞を選別して単離する方法である。

しかし、これらの方法は細胞特異的なプロモーターの活性（発現強度）に著しく左右されてしまうという大きな問題点があり、その応用と効用は非常に限定的であった。すなわち、細胞特異的なプロモーターは特異
20 性はあっても活性が弱い場合、分化した目的細胞を選別、単離するのに十分な強度のマーカー遺伝子の発現が得られず目的細胞を選別できないため、この方法が適応できるものは非常に限定されるというのが実情であった。また、実験を計画をする段階で確実にこの方法が有用であるか否かを予想することは困難で、予想される結果が不確かであるにも拘わ
25 らず目的細胞に分化させて単離するためにES細胞株を目的毎に1つ1つ作成し、分化した目的細胞の1つ1つについて検証をしなければならず、多大な労力と時間を使いながら結果として目的細胞を単離できないこと

また、本発明は、上記の第１の組換えＤＮＡを含む第１の遺伝子導入用ベクターと上記の第２の組換えＤＮＡを含む第２の遺伝子導入用ベク

ターとを備えた胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キットである。

また、本発明は、上記の第1の組換えDNAが導入された胚性幹細胞と、上記の第2の組換えDNAを含む第2の遺伝子導入用ベクターとを
5 備えた胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キットである。

また、本発明は、上記の第1の組換えDNAを含む第1の遺伝子導入用ベクターと、上記の第2の組換えDNAが導入された胚性幹細胞とを
10 備えた胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キットである。

また、本発明は、上記の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法により得られる細胞又はこの細胞を含む組織である。

また、本発明は、上記の細胞及び／又は組織を用いる疾患の治療法である。

15 本発明の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的分離又は可視化方法は、各種動物に由来するES細胞に適用ができ、例えばマウス、ラット、サル、ヒトなどすでに樹立されている種は勿論のこと、今後樹立されるであろう他の種のES細胞にも用いることが可能であり、ES細胞の動物種、種類により特に限定されない。

20 ES細胞の取扱いの標準的な方法は、Brigid Hogan他著、山内一也他訳、「マウス胚の操作マニュアル」、近代出版（1997）、あるいは相沢慎一著、「ジントーゲッティング：ES細胞を用いた変異マウスの作製」、実験医学別冊、バイオマニュアルシリーズ8、羊土社（1995）などに記載されている。

25 本発明に用いる第1の組換えDNAとは、第1のプロモーター、リコンビナーゼ認識配列を両端に有する遺伝子、胚性幹細胞から分化する目的細胞の選択マーカー遺伝子とが5'から順に配置されたものを遺伝子組

換え技術により作成したものである。第1のプロモーターとは、選択マーカー遺伝子を十分に発現させられない第2のプロモーターより活性が高く、選択マーカー遺伝子を発現させるに足るプロモーターであれば特に限定されるものではなく、例えばCA（サイトメガロウイルスエンハンサーとニワトリ β アクチンプロモーターのハイブリッドプロモーター）プロモーターやCMV（サイトメガロウイルス初期遺伝子エンハンサー・プロモーター）プロモーターなどの恒常的強発現プロモーターが好適である。なお、恒常的強発現プロモーターとは、該プロモーターに繋いだ目的遺伝子をES細胞を初めとするほとんどの細胞に導入した場合、目的

5 10 の遺伝子を恒常的に強く発現させるプロモーターのことをいう。

リコンビナーゼ認識配列は、特異的なDNA組換え酵素であるリコンビナーゼにより認識される塩基配列であれば特に限定されず、リコンビナーゼにより二つのリコンビナーゼ認識配列で挟まれたDNA鎖の切断、置換、結合というDNAの組換え反応を生じるloxPやFRTなどの特異

15 的な塩基配列をいう。

リコンビナーゼ発現遺伝子は、リコンビナーゼを発現する遺伝子で、loxPを認識するバクテリオファージP1由来のリコンビナーゼCre（Sternberg et al. J. Mol. Biol. Vol. 150, 467-486 (1981)）、FRTを認識する酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)由来のリコンビナーゼFLP

20 (Babineau et al., J. Biol. Chem. Vol. 260, 12313-12319 (1985))、チゴサッカロマイセス・ルーイのpSR1プラスミド由来のR(Matsuzaki et al., Mol. Cell. Biol. Vol. 8, 955-962 (1988))を発現する遺伝子などを代表例として挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

25 選択マーカー遺伝子は、第2の組換えDNAがES細胞に導入された後、第1のプロモーターにより発現しES細胞から分化した目的細胞を特異的に選別するための指標として用いるもので、EGFP (Enhanced Green

Fluorescent Protein) やGFP (Green Fluorescent Protein) などの発
光蛋白遺伝子や種々の薬剤耐性遺伝子を挙げることができるが、選択マ
ーカーとして用い得ればこれらに限定されない。特に、発光蛋白遺伝子
は、目的細胞を可視化でき、フローサイトメトリーなどを用いてその選
5 別単離が容易になるのでより好ましい。また、発光蛋白遺伝子は、恒常
的強発現プロモーターを用いた場合、分化した目的細胞から更に分化し
た細胞をも永続的、恒常的に標識して可視化できるので、分化系統、組
織系統が培養皿上で観察、解析することが可能となるので、好ましい。

本発明に用いる第2の組換えDNAとは、胚性幹細胞から分化する目
10 的細胞に対して特異的に発現する第2のプロモーター、リコンビナーゼ
発現遺伝子が5'から順に配置されたものを遺伝子組換え技術により作成
したものである。第2のプロモーターとは、分化する目的細胞でのみ特
異的に発現する遺伝子のプロモーター領域のことである。その例として
は、心筋細胞のNkx2.5, MEF-2, GATA-4, 心筋型アクチン、心筋型 α ミ
15 オシン重鎖(α -cardiac myosin heavy chain: 以下、 α MHCという)蛋白、
ミオシン軽鎖2v(myosin light chain-2v: MLC2v)蛋白、脳の神経細
胞のネスチンnestin、脳のグリア細胞のglial fibrillary acidic
protein (GFAP)、より未分化な肝細胞の α フェトプロテイン
 α -fetoprotein (AFP)、(成熟した)肝細胞のアルブミンalbumin、骨
20 髄芽細胞のオステオカルシンosteocalcin、膵臓 β 細胞の膵・十二指腸
ホメオボックス遺伝子1pancreatic and duodenal homeobox gene 1
(PDX-1)、血管(内皮細胞)のflt-1、表皮ケラチン細胞のケラチン14
keratin14 (K14)、骨格筋細胞の筋クレアチンキナーゼmuscle
creatine kinaseなどの遺伝子のプロモーターが挙げられる。これらの
25 プロモーターに繋がれたリコンビナーゼ発現遺伝子は、ES細胞がその目
的細胞に分化したときに限定してリコンビナーゼを発現する。

ES細胞への第1の組換えDNAあるいは第2の組換えDNAの導入に

は、それぞれの組換えDNAと共に薬剤耐性遺伝子を有するプラスミドをエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DAEデキストラン法などの分子生物学の一般的な方法で導入して、その後、薬剤添加培地で細胞を1-2週間培養することにより、染色体にこれらの組換えDNAが組み込まれ安定かつ永続的に遺伝子を発現するES細胞のクローンを採取して、分化の実験に用いることができる。さらに有用な方法として、第1の組換えDNAあるいは第2の組換えDNAを含む遺伝子導入用ベクターをそれぞれ作成し、これにより簡便かつ非常に効率的にES細胞に組換えDNAを導入することができる。遺伝子導入用ベクターの例としては、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノアソシエートベクター、センダイウイルスベクターなど、非ウイルスベクターとして、カチオニックリポソーム、HVJリポソームなどが挙げられるが、これらに限定されない。

次に、本発明の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法の原理を典型的な例を用いて第1図を参照しながら説明する。

第1の組換えDNAは、第1のプロモーター（図中、CAプロモーター）、リコンビナーゼ認識配列としてloxP配列、ES細胞から分化した目的細胞の選択マーカーとしてEGFP遺伝子が5'側から順に配置され、2つのloxP配列間には、マーカーのNeo遺伝子とポリAシグナルが配置され、EGFP遺伝子の下流には、ポリAシグナルが配置されている。なお、リコンビナーゼ認識配列間に配置されるマーカーは、Neo遺伝子に限定されるものではなく、様々なマーカー遺伝子を用いることができる。また、ポリAシグナルも特に限定されず、牛成長ホルモンのポリAシグナル、ラビットβ-グロビンポリAシグナルなど様々なポリAシグナルを用いることができる。

また、第2の組換えDNAは、第2のプロモーター（図中、Nkx2.5遺

伝子プロモーター又は α MHC遺伝子プロモーター)、リコンビナーゼCreの順で5'側から配置されている。リコンビナーゼCreの下流には、ポリAシグナルが配置されている。

第1の組換えDNAと第2の組換えDNAが導入されたES細胞が、目的の細胞に分化誘導されることにより第2のプロモータが発現し、リコンビナーゼCreが作用してloxP配列で囲まれた部分が切り出されると、第1のプロモーターによりEGFP遺伝子が強く発現し、蛍光を指標にして目的細胞の心筋細胞を可視化でき、フローサイトメトリーなどにより簡便かつ容易に選別単離することができる。

10

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法を模式的に示す説明図である。第2図は、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率を示す蛍光顕微鏡写真像である。(a) フィーダー細胞上で培養したマウスES細胞(R1細胞)の蛍光顕微鏡写真像 (b) フィーダー細胞無しで培養したマウスES細胞(D3細胞)の蛍光顕微鏡写真像 (c) 分化誘導中のマウスES細胞(D3細胞)の蛍光顕微鏡写真像。なお、(a)～(c)は、MOI100でAd.CMV-LacZを感染させ、x-gal染色したものであり、各蛍光顕微鏡写真像の右上はその位相差顕微鏡写真像を示す。第3図は、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率を示すグラフである。(a) 各MOIでアデノウイルスベクターによるES細胞(R1細胞)の遺伝子導入効率を示すグラフである。(b) 各MOIでアデノウイルスベクターによるES細胞(D3細胞)の遺伝子導入効率を示すグラフである。第4図は、本発明の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法によりEGFPで可視化されたES細胞の蛍光顕微鏡写真像である。(a) 陰性コントロールとして、Ad.CMV-LacZを感染させたもので、EGFPの発現はない。(b) 陽性コントロール

として、Ad. CA-LacZを感染させたもので、遺伝子導入効率に一致して、60～70%位の細胞がEGFPの発現により可視化されている。(c) Ad. Nkx2.5-Creを第4日に感染させ、第6日に観察したもので、目的細胞と思われる細胞が散在して可視化されている。(d) Ad. α MHC-Creを第13日に観察したもので、目的細胞と思われる細胞が可視化されている。第5図は、Ad. CMV-LacZ、Ad. Nkx2.5-Cre及びAd. α MHC-Creの発現を指標に単離された細胞のフローサイトメトリーのチャートである。第6図は、(a) Ad. Nkx2.5-Cre、(b) Ad. α MHC-Creの発現を指標に単離された細胞の免疫細胞染色の蛍光顕微鏡写真像である。(a) 左の写真像がEGFP、中央の写真像が目的の蛋白の発現を示しており、上段はSMA、下段はトロポミオシン(TM)で、それぞれに対する特異的な抗体により免疫蛍光染色したものである。また、右の写真像は左の写真像と中央の写真像を重ね合わせた写真像で、EGFPと目的の蛋白が同じ細胞で発現していることを示している。(b) 左の写真像がEGFP、中央の写真像が目的の蛋白の発現を示しており、上段は α MHC、下段はアクチニンで(いずれも心筋細胞特異的な分子)、それぞれに対する特異的な抗体により免疫蛍光染色したものである。また、右の写真像は左の写真像と中央の写真像を重ね合わせた写真像で、EGFPと目的の蛋白が同じ細胞で発現していることを示している。第7図は、恒常的強発現プロモーターのCAプロモーター及び組織特異的遺伝子のNkx2.5プロモーターと α MHCプロモーターにより発現したリコンビナーゼCreの電気泳動像を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。なお、比較例、実施例のプラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞などを取り扱う遺伝子工学技術ならびに細胞培養技術などは、特に断らない限り、
「Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubelら編、(1994),

John Wiley & Sons, Inc.] 並びに「Culture of Animal Cells; A Manual of Basic Technique, R. Freshney編、第2版(1987), Wiley-Liss」に記載の方法に準じて行った。また特に断りがない限り、ES細胞の培養、取り扱いに関しては前述のBrigid Hogan他著、山内一也他訳、
5 「マウス胚の操作マニュアル」、近代出版(1997)、あるいは相沢慎一著、「ジントーゲッティング: ES細胞を用いた変異マウスの作製」、実験医学別冊、バイオマニュアルシリーズ8、羊土社(1995)に記載の方法、アデノウイルスの一般的な取り扱いに関しては特に断りがない限り、Frank L. Graham著、Manipulation of adenovirus vectors、Chapater
10 11. p109-p128、; E.J. Murray編、Methods in Molecular Biology, Vol. 7: Gene Transfer and Expression Protocols (1991)、アデノウイルスの作成については、Chen, S-H. et al., Combination gene therapy for liver metastases of colon carcinoma in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1995) 92, 2477-2581.、あるいはMizuguchi
15 et al, Human Gene Ther., Vol. 9, 2577-2583, (1998) に記載の方法に準じて行った。

〔比較例〕

以下、従来の胚性幹細胞の単離方法を比較例として記載する。

Nkx2.5遺伝子プロモーターは、Yutzey氏より供与を受けたものを使用
20 した。Yutzeyらは、Nkx2.5遺伝子の5' 上流のゲノム解析により、Nkx2.5遺伝子の心筋特異的な発現調節を可能とするプロモーター領域について詳しい検討を行っている(詳細は、Development. Vol.125, 4461-4470 (1998)に記載)。これによると転写開始点より5' 上流の-3059bp
25 まで含む領域が、Nkx2.5遺伝子の心筋特異的に十分な発現レベルで発現するための最適なプロモーター領域として働くことが確認されている。

ちなみに、これより短い領域、つまり転写開始点より5' 上流-959bp
まで、あるいは逆にこれより長い領域、つまり転写開始点より5' 上流-

9000bpでも、心筋特異的に十分な発現レベルでこの下流の遺伝子を発現させることはできないことが上記の論文で示されている。このNkx2.5遺伝子の転写開始点より5'上流の-3059bpの領域、マーカー遺伝子の大腸菌のlacZ遺伝子、SV40 small t-intronとpolyA signalがプラスミド

- 5 pBlueScript SKに挿入されたpNkx2.5-IA-LacZプラスミドをYutzey氏より供与を受けた（詳細は上記Development. Vol. 125, 4461-4470 (1998)に記載）。pNkx2.5-IA-LacZ（論文での記載名は-3059Nkx2.5lacZ）は心筋細胞特異的にLacZ遺伝子を発現することが確認されている。

- 次いで、プラスミドのpEGFP-C1（クロンテック社、カタログ番号6084-
10 1）から制限酵素のNheIとBclI処理によりEGFP（enhanced green fluorescent protein）遺伝子を切り出し、切り出したEGFP遺伝子の両末端をT4 DNAポリメラーゼIにより平滑化した。pNkx2.5-IA-LacZを制限酵素のSalIで切断し、T4 DNAポリメラーゼIで末端を平滑化し、自己ライゲーションを防ぐためCalf Intestine Phosphatase (CIP) 酵素で末端
15 脱リン酸化処理した後、切り出したEGFP遺伝子とT4 DNAリガーゼで反応させライゲーション反応を行い、プラスミドpBS-Nkx2.5-EGFPを作成した。

- 一方、プラスミドpBS-loxP-Neoは、プラスミドpBS246（旧GIBCO BRL社、現Invitrogen社、カタログ番号10348-019）のリコンビナーゼ認識配列のloxP配列2個の間のマルチクローニングサイト中のHindIII-BamHI間に、5'側よりpGKプロモーター、Neo遺伝子（G418薬剤耐性遺伝子）、bovine growth hormoneのpoly A signalの順で連結された遺伝子を挿入することにより作成した。このプラスミドpBS-loxP-Neoを制限酵素のNotIで切断しCIP処理を行い精製したものと、pBS-Nkx2.5-EGFPを
25 NotIで切り出した遺伝子断片（転写開始点から-3059までのNkx2.5プロモーター、EGFP遺伝子、SV40 small t-intronとpolyA signalが連結された遺伝子）とを、T4 DNAリガーゼで反応させ、pNkx2.5-EGFP-loxP-

Neoを作成した。pNkx2.5-EGFP-loxP-Neoは、pBluescriptのバックボーンを持ち、5'側よりNkx2.5遺伝子プロモーター（転写開始点から-3059まで）、EGFP遺伝子、SV40 small t-intronとpolyA signal、loxP配列、pGKプロモーター、Neo遺伝子、bovine growth hormoneのpoly A signal、

5 loxP配列が順に挿入されたプラスミドである。

このプラスミドpNkx2.5-EGFP-loxP-NeoをマウスES細胞株のR1細胞にエレクトロポレーション法（バイオラド社のGene Pulser IIで、0.2mmのcuvetteで150mV、950 μ Fで通電）により遺伝子導入して、翌日より薬剤選択のための抗生剤のG418を150 μ g/mlの濃度でLIF（マウスleukemia

10 inhibitory factorの組換え蛋白：旧GIBCO BRL社、現Invitrogen社、商品名ESGR0）添加のES細胞用培地に加え、1-2週間後にコロニーが十分に分離できたところで、この薬剤耐性のES細胞株クローンをとった。3回の実験によりG418耐性のクローンを78個採取した。

尚、ES細胞用培地は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (high

15 glucose条件, L-glutamine, 110mg/L sodium pyruvateが含有：シグマ社）に、NaHCO₃、125 μ M 2-mercaptoethanol（ナカライ社）、非必須アミノ酸（Invitrogen社）、核酸、20%胎児牛血清（Invitrogen社）、ストレプトマイシン、ペニシリンを加えたものである。なお、ES細胞の未分化能を維持する際はこのES細胞用培地に10³ U/mLでLIFを加えて培養し、

20 ES細胞の分化誘導の際はこのES細胞用培地単独でLIFは添加しないで培養する。

これらのクローンES細胞からDNAを抽出し、ゲノミックPCRを行い、EGFPを増幅するために設計したプライマーで25クローン陽性、連結されたNkx2.5遺伝子プロモーターとEGFPを含む領域を増幅するために設計した

25 プライマーで16クローン陽性、さらにこの両者のプライマーセットでいずれも陽性だったものが13クローンであった。少なくともこの13クローンは正しく目的の遺伝子が導入されていると考えられるため、以降の

実験にはダブルポジティブのこの13クローンを用いた。

上記の13クローンのES細胞を2つの分化誘導系にのせた。一つの系はES細胞を細胞非接着の皿でLIF非添加のES細胞用培地で浮遊させて培養することにより、embryoid bodyと呼ばれる初期胚と似た細胞塊が形成された。このembryoid bodyを3日目（LIFを除いた分化誘導開始から3日後）から接着の培養皿に移しLIF非添加のES細胞用培地で接着状態で培養すると、7日目（LIFを除いた分化誘導開始から7日後）位から14日目位にかけて、生体の心筋細胞のように自己拍動する細胞塊が出現してきた。

10 もう一つの系はST2細胞というマウス間質細胞の上にES細胞をのせてLIF非添加のES細胞用培地で共培養する分化誘導系である。これもLIFを除いてこのST2細胞の上にES細胞をのせて7～9日後位より、生体の心筋のように自動収縮する細胞塊がところどころに出現してきた。

この2つの分化系に載せて7日後から14日後までの各日の細胞塊からRNAを抽出し、RT-PCR法を行うと、心筋特異的な遺伝子（Nkx2.5、 α MHC、MLC2vなど）の発現誘導が確認された。また同時期の細胞塊の免疫染色により筋特異的や心筋特異的な蛋白質（ α アクチニン、トロポミオシン、Nkx2.5、MLC2v）などの発現も確認でき、これらの自動収縮する細胞塊が心筋細胞に分化していることが証明された。

20 一方、この4日後から14日後の心筋に分化した細胞塊から抽出したRNAからEGFP遺伝子のmRNAをRT-PCR法で増幅しても、いずれにおいても陽性の所見はみられなかった。そしてこれらのES細胞から分化した心筋細胞塊は、いずれのES細胞クローンから誘導されたものも、蛍光顕微鏡で可視化することも、またセルソーターで単離可能なレベルの明らかなEGFPの発現もみられなかった。前述のように、このNkx2.5遺伝子プロモーター(-3059)は、Yutzeyらが、Development. Vol. 125, 4461-4470 (1998)で報告しているものと同様のものであり、このプロモーターに繋い

だ遺伝子は、マウスの発生において早期より心臓の予定領域に発現し、
心筋細胞に比較的特異的に発現することが確認されたものである。

Yutzeyらが用いたLacZ遺伝子の発現を組織のx-gal染色で検出する方法は酵素反応であるため検出感度は比較的高く、検出に必要なLacZ遺伝子
5 子の発現レベルは非常に微量で良いものの、細胞を生きたままで可視化、
単離するためにはLacZ遺伝子をマーカー遺伝子として用いることができない。
そのため、このような目的にはEGFP遺伝子をマーカー遺伝子として用いるのが一般的であるが、一方EGFPを蛍光顕微鏡で可視化させたり
セルソーターで分離するためにはある程度のEGFP遺伝子の発現量が必要
10 である。つまりこの遺伝子が正しく組み込まれて、またES細胞が心筋に
分化したにも関わらずEGFPの発現がみられないのは、このNkx2.5遺伝子
プロモーターに繋がれた遺伝子は心筋特異的な発現は生じて、EGFPを
可視化できるレベルの発現活性を持たないためである。このように、従
来法では目的の細胞に分化した心筋細胞をNkx2.5遺伝子プロモーターから
15 EGFP遺伝子を発現させることで可視化し、また、セルソーターで単離する
という試みはいずれも不可能であった。

〔実施例1〕

5' 側より、CMVプロモーター(human cytomegalovirus immediate
early promoter)あるいはCAプロモーター (cytomegalovirus enhancer+
20 chicken β -actin promoter)、その下流に2つのloxP配列で囲まれた
Neo遺伝子、さらにその下流のマーカー遺伝子にEGFP遺伝子を配置した
第1の組換えDNAを含むプラスミドpCMV-loxP-Neo-EGFPならびにpCA-
loxP-Neo-EGFPを作成したが、その作成過程を以下に記載する。

まずpcDNA3プラスミド(Invitrogen社)を制限酵素のBclIとBsmIで処理
25 してNeo遺伝子を切り出し、その断端をT4 DNAポリメラーゼI処理により
平滑末端化する(インサート)。pBS246プラスミド(旧GIBCO BRL社、
現Invitrogen社)を制限酵素のHindIIIとBamHIで切断しCIP処理する(ベ

クター)。このインサートとベクターの両者をT4 DNAリガーゼで反応させライゲーションすることで、pBS246のloxP配列の間にneo遺伝子が挿入されたプラスミドのpBS-loxP-Neoを得た。

次に、このpBS-loxP-Neoを制限酵素NotIで切り出し、T4 DNAポリメラーゼIで処理し、2つのloxP配列とそれに囲まれたNeo遺伝子の遺伝子断片を回収した（インサート）。一方、CMVプロモーターが導入されているプラスミドpIRES-EGFP（クロンテック社、カタログ番号#6064-7）を制限酵素ClaIとBamHIで処理し、MCS（マルチクローニングサイト）、IVS（synthetic intron）、IRES（internal ribosome entry site）を除いたベクター部分を回収し、これをT4 DNAポリメラーゼIで末端平滑化した（ベクター）。このインサートとベクターの両者をT4 DNAリガーゼでライゲーションすることにより、目的の一つのプラスミドpCMV-loxP-Neo-EGFPを得た。

さらにプラスミドpCMV-loxP-Neo-EGFPをBglIIとEcoRIで処理しCMVプロモーター部を除き、T4 DNAポリメラーゼIで断端を平滑末端化、CIP処理をした（ベクター）。一方、コスミドpAdex1Cawt（タカラ社、コード番号6150）をPmeIとSwaIで処理して、CAプロモーター部を切り出し、T4 DNAポリメラーゼIで断端を平滑末端化した（インサート）。このインサートと前記ベクターの両者をT4 DNAリガーゼで反応させライゲーションを行い、もう一つの目的プラスミドpCA-loxP-Neo-EGFPを得た。

プラスミドpCMV-loxP-Neo-EGFPあるいはpCA-loxP-Neo-EGFPを別々にES細胞（D3細胞）にエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、150 μ g/mL G418と 10^5 U/L LIF添加したES細胞用培地にて1-2週間培養することにより、ES細胞クローンを単離した。これらの手技は比較例の項で詳細に記載した通りである。pCMV-loxP-Neo-EGFPを遺伝子導入したクローンを70個、pCA-loxP-Neo-EGFPを59個採取した。

また、5'側より、Nkx2.5プロモーター(-3059)、リコンビナーゼのCre

遺伝子、bovine growth hormone poly A signalを配置した第2の組換えDNAを作成し、さらにその遺伝子を含むアデノウイルスベクターAd.Nkx2.5-Creを下記のように作成した。

- まずプラスミドpHMCMV6 (Mark Kay氏より供与：プラスミドの詳細はH. Mizuguchi and M. Kay: Human Gene Ther vol. 10: 2013-201 (1999)に記載、現在、クロンテック社より販売) をNheIとMunIで処理してCMVプロモーターを除いた後にT4 DNAリガーゼでライゲーションを行った。さらにこのプラスミドをAflIIIで切断しT4 DNAポリメラーゼIで断端の平滑末端化を行い (ベクター)、この場所にプラスミドpBS185 (旧GIBCO BRL社、現Invitrogen社) よりXhoIとMluIでCre遺伝子を切り出してT4 DNAポリメラーゼIで平滑末端化したインサートを、T4 DNAリガーゼでライゲーション反応をおこない挿入し、プラスミドpHMΔp-Creを得た。つまりpHMΔp-Creは、プロモーターを持たず、任意のプロモーターを簡単に挿入するためのマルチクローニングサイトを持ち、その下流にCre遺伝子、bovine growth hormone poly A signalを持つプラスミドである。

- 比較例で記載したpNXK2.5-IA-LacZをNotIとXbaIで切り出しT4 DNAポリメラーゼで平滑末端化したNkx2.5遺伝子プロモーター部分 (インサート) を、pHMΔp-CreをNotIで切断しT4 DNAポリメラーゼIで平滑末端化しCIP処理したベクターに、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、プラスミドpHM-Nkx2.5-Creを得た。

- さらにpHM-Nkx2.5-CreをI-CeuI、PI-SceIで切断したインサート、ならびにアデノウイルスベクタープラスミドpAdHM4 (Mark Kay氏より供与：プラスミドの詳細はH. Mizuguchi and M. Kay: Human Gene Ther vol. 10: 2013-201 (1999)に記載) をI-CeuI、PI-SceIで切断したベクターを、T4 DNAリガーゼでライゲーションすることにより、アデノウイルスベクタープラスミドpAdHM4-Nkx2.5-Creを得た。pAdHM4-Nkx2.5-CreをPacIで切断し精製したものを293細胞に遺伝子導入し、10-14日後に出

現したアデノウイルスAd. Nkx2. 5-Creのプラークを回収し、これを293細胞でウイルスの増幅を行い、CsClの密度勾配法による精製、カラムによる脱塩を行った(方法の詳細は最初に記載した引用文献、著書に記載)。

このAd. Nkx2. 5-Creはヒト5型アデノウイルスベクターで、細胞に感染、
5 遺伝子導入後はNkx2. 5遺伝子プロモーターの制御下にCre遺伝子を発現する。

また同様の方法でpHMΔp-CreにCAプロモーターを挿入して、同様の方法でアデノウイルスベクターAd. CA-Creを作成した。Ad. CA-Creはヒト5型アデノウイルスベクターで、細胞に感染、遺伝子導入後はCAプロモーターの制御下にCre遺伝子を発現する。CAプロモーターはES細胞を含む
10 ほとんどの細胞で、下流の遺伝子を恒常的に強く発現させることができるため、Ad. CA-Creを感染させた細胞はその分化状態に関わらず細胞内で恒常的にCre酵素を発現する。

次に、アデノウイルスベクターのES細胞に対する遺伝子導入効率を調べた。まずCMVプロモーターの制御下にLacZ遺伝子を発現するヒト5型アデノウイルスベクターAd. CMV-lacZを前述の方法で作成した。Ad. CMV-LacZを各MOI (multiplicity of infection; 感染可能なウイルス数/細胞数) で感染させ、x-gal染色で陽性細胞の割合を評価したところ、MOIを上げるに従い遺伝子導入効率は上昇した(第2図、第3図参照)。そして R1、D3のいずれのES細胞でも、またフィーダー細胞有り、無し
20 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100 5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400 5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890 5900 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100 6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200 6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300 6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600 6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200 7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300 7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400 7410 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490 7500 7510 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690 7700 7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800 7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900 7910 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000 8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090 8100 8110 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190 8200 8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290 8300 8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400 8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500 8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600 8610 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690 8700 8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800 8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 8900 8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000 9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100 9110 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200 9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280 9290 9300 9310 9320 9330 9340 9350 9360 9370 9380 9390 9400 9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480 9490 9500 9510 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600 9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680 9690 9700 9710 9720 9730 9740 9750 9760 9770 9780 9790 9800 9810 9820 9830 9840 9850 9860 9870 9880 9890 9900 9910 9920 9930 9940 9950 9960 9970 9980 9990 10000 10010 10020 10030 10040 10050 10060 10070 10080 10090 10100 10110 10120 10130 10140 10150 10160 10170 10180 10190 10200 10210 10220 10230 10240 10250 10260 10270 10280 10290 10300 10310 10320 10330 10340 10350 10360 10370 10380 10390 10400 10410 10420 10430 10440 10450 10460 10470 10480 10490 10500 10510 10520 10530 10540 10550 10560 10570 10580 10590 10600 10610 10620 10630 10640 10650 10660 10670 10680 10690 10700 10710 10720 10730 10740 10750 10760 10770 10780 10790 10800 10810 10820 10830 10840 10850 10860 10870 10880 10890 10900 10910 10920 10930 10940 10950 10960 10970 10980 10990 11000 11010 11020 11030 11040 11050 11060 11070 11080 11090 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11200 11210 11220 11230 11240 11250 11260 11270 11280 11290 11300 11310 11320 11330 11340 11350 11360 11370 11380 11390 11400 11410 11420 11430 11440 11450 11460 11470 11480 11490 11500 11510 11520 11530 11540 11550 11560 11570 11580 11590 11600 11610 11620 11630 11640 11650 11660 11670 11680 11690 11700 11710 11720 11730 11740 11750 11760 11770 11780 11790 11800 11810 11820 11830 11840 11850 11860 11870 11880 11890 11900 11910 11920 11930 11940 11950 11960 11970 11980 11990 12000 12010 12020 12030 12040 12050 12060 12070 12080 12090 12100 12110 12120 12130 12140 12150 12160 12170 12180 12190 12200 12210 12220 12230 12240 12250 12260 12270 12280 12290 12300 12310 12320 12330 12340 12350 12360 12370 12380 12390 12400 12410 12420 12430 12440 12450 12460 12470 12480 12490 12500 12510 12520 12530 12540 12550 12560 12570 12580 12590 12600 12610 12620 12630 12640 12650 12660 12670 12680 12690 12700 12710 12720 12730 12740 12750 12760 12770 12780 12790 12800 12810 12820 12830 12840 12850 12860 12870 12880 12890 12900 12910 12920 12930 12940 12950 12960 12970 12980 12990 13000 13010 13020 13030 13040 13050 13060 13070 13080 13090 13100 13110 13120 13130 13140 13150 13160 13170 13180 13190 13200 13210 13220 13230 13240 13250 13260 13270 13280 13290 13300 13310 13320 13330 13340 13350 13360 13370 13380 13390 13400 13410 13420 13430 13440 13450 13460 13470 13480 13490 13500 13510 13520 13530 13540 13550 13560 13570 13580 13590 13600 13610 13620 13630 13640 13650 13660 13670 13680 13690 13700 13710 13720 13730 13740 13750 13760 13770 13780 13790 13800 13810 13820 13830 13840 13850 13860 13870 13880 13890 13900 13910 13920 13930 13940 13950 13960 13970 13980 13990 14000 14010 14020 14030 14040 14050 14060 14070 14080 14090 14100 14110 14120 14130 14140 14150 14160 14170 14180 14190 14200 14210 14220 14230 14240 14250 14260 14270 14280 14290 14300 14310 14320 14330 14340 14350 14360 14370 14380 14390 14400 14410 14420 14430 14440 14450 14460 14470 14480 14490 14500 14510 14520 14530 14540 14550 14560 14570 14580 14590 14600 14610 14620 14630 14640 14650 14660 14670 14680 14690 14700 14710 14720 14730 14740 14750 14760 14770 14780 14790 14800 14810 14820 14830 14840 14850 14860 14870 14880 14890 14900 14910 14920 14930 14940 14950 14960 14970 14980 14990 15000 15010 15020 15030 15040 15050 15060 15070 15080 15090 15100 15110 15120 15130 15140 15150 15160 15170 15180 15190 15200 15210 15220 15230 15240 15250 15260 15270 15280 15290 15300 15310 15320 15330 15340 15350 15360 15370 15380 15390 15400 15410 15420 15430 15440 15450 15460 15470 15480 15490 15500 15510 15520 15530 15540 15550 15560 15570 15580 15590 15600 15610 15620 15630 15640 15650 15660 15670 15680 15690 15700 15710 15720 15730 15740 15750 15760 15770 15780 15790 15800 15810 15820 15830 15840 15850 15860 15870 15880 15890 15900 15910 15920 15930 15940 15950 15960 15970 15980 15990 16000 16010 16020 16030 16040 16050 16060 16070 16080 16090 16100 16110 16120 16130 16140 16150 16160 16170 16180 16190 16200 16210 16220 16230 16240 16250 16260 16270 16280 16290 16300 16310 16320 16330 16340 16350 16360 16370 16380 16390 16400 16410 16420 16430 16440 16450 16460 16470 16480 16490 16500 16510 16520 16530 16540 16550 16560 16570 16580 16590 16600 16610 16620 16630 16640 16650 16660 16670 16680 16690 16700 16710 16720 16730 16740 16750 16760 16770 16780 16790 16800 16810 16820 16830 16840 16850 16860 16870 16880 16890 16900 16910 16920 16930 16940 16950 16960 16970 16980 16990 17000 17010 17020 17030 17040 17050 17060 17070 17080 17090 17100 17110 17120 17130 17140 17150 17160 17170 17180 17190 17200 17210 17220 17230 17240 17250 17260 17270 17280 17290 17300 17310 17320 17330 17340 17350 17360 17370 17380 17390 17400 17410 17420 17430 17440 17450 17460 17470 17480 17490 17500 17510 17520 17530 17540 17550 17560 17570 17580 17590 17600 17610 17620 17630 17640 17650 17660 17670 17680 17690 17700 17710 17720 17730 17740 17750 17760 17770 17780 17790 17800 17810 17820 17830 17840 17850 17860 17870 17880 17890 17900 17910 17920 17930 17940 17950 17960 17970 17980 17990 18000 18010 18020 18030 18040 18050 18060 18070 18080 18090 18100 18110 18120 18130 18140 18150 18160 18170 18180 18190 18200 18210 18220 18230 18240 18250 18260 18270 18280 18290 18300 18310 18320 18330 18340 18350 18360 18370 18380 18390 18400 18410 18420 18430 18440 18450 18460 18470 18480 18490 18500 18510 18520 18530 18540 18550 18560 18570 18580 18590 18600 18610 18620 18630 18640 18650 18660 18670 18680 18690 18700 18710 18720 18730 18740 18750 18760 18770 18780 18790 18800 18810 18820 18830 18840 18850 18860 18870 18880 18890 18900 18910 18920 18930 18940 18950 18960 18970 18980 18990 19000 19010 19020 19030 19040 19050 19060 19070 19080 19090 19100 19110 19120 19130 19140 19150 19160 19170 19180 19190 19200 19210 19220 19230 19240 19250 19260 19270 19280 19290 19300 19310 19320 19330 19340 19350 19360 19370 19380 19390 19400 19410 19420 19430 19440 19450 19460 19470 19480 19490 19500 19510 19520 19530 19540 19550 19560 19570 19580 19590 19600 19610 19620 19630 19640 19650 19660 19670 19680 19690 19700 19710 19720 19730 19740 19750 19760 19770 19780 19790 19800 19810 19820 19830 19840 19850 19860 19870 19880 19890 19900 19910 19920 19930 19940 19950 19960 19970 19980 19990 20000 20010 20020 20030 20040 20050 20060 20070 20080 20090 20100 20110 20120 20130 20140 20150 20160 20170 20180 20190 20200 20210 20220 20230 20240 20250 20260 20270 20280 20290 20300 20310 20320 20330 20340 20350 20360 20370 20380 20390 20400 20410 20420 20430 20440 20450 20460 20470 20480 20490 20500 20510 20520 20530 20540 20550 20560 20570 20580 20590 20600 20610 20620 20630 20640 20650 20660 20670 20680 20690 20700 20710 20720 20730 20740 20750 20760 20770 20780 20790 20800 20810 20820 20830 20840 20850 20860 20870 20880 20890 20900 20910 20920 20930 20940 20950 20960 20970 20980 20990 21000 21010 21020 21030 21040 21050 21060 21070 21080 21090 21100 21110 21120 21130 21140 21150 21160 21170 21180 21190 21200 21210 21220 21230 21240 21250 21260 21270 21280 21290 21300 21310 21320 21330 21340 21350 21360 21370 213

細胞に遺伝子を導入することができた（第2図c参照）。このようにアデノウイルスベクターを使うことで、ES細胞に簡単に高率にいずれの分化段階でも遺伝子を導入することが確認できた。特に分化誘導中はエレクトロポレーション法などの従来の一般的な遺伝子導入法では遺伝子導入することが困難であるため、アデノウイルスベクターの使用は非常に有用であることが分かった。

第1の組換えDNAが組み込まれたpCMV-loxP-Neo-EGFPが安定導入されたES細胞の70クローンのうち、まず34個をEGFPを増幅する比較例で設計したプライマーセットによるゲノミックPCRを行ったところ、そのうちの31個が陽性であった。またこの31個のES細胞クローンにAd. CA-Creを感染させたところ、4クローンが蛍光顕微鏡による観察で十分な発現強度をもって可視化された（この4クローンはいずれもEGFPのゲノミックPCRで陽性）。つまりゲノミックPCRでEGFP遺伝子の挿入を確認せずとも、直接Ad. CA-Cre感染でスクリーニングする方が、より発現の強いクローンを迅速に選別できるため、以降は得られたES細胞クローンは直接Ad. CA-Cre感染によるEGFPの発現強度により、目的のクローンを選別することにした。pCMV-loxP-Neo-EGFPが安定導入された残りの34クローンをAd. CA-Cre感染後の（蛍光顕微鏡での観察による）EGFP発現強度でスクリーニングしたところ、11クローンはEGFP強発現、4クローンはEGFP弱発現であった。つまり、pCMV-loxP-Neo-EGFPが安定導入された合計70クローンから15クローン（弱い発現もいれると19クローン）の目的のものを採取できた。

一方、pCA-loxP-Neo-EGFPが安定導入された59クローンのES細胞を、Ad. CA-Cre感染後のEGFP発現で直接スクリーニングしたところ、16クローンはEGFP強発現する目的のものであった。

pCMV-loxP-Neo-EGFPとpCA-loxP-Neo-EGFPがそれぞれ安定導入されたES細胞は、いずれもAd. CA-Creを感染しない場合、あるいはCre遺伝子を

発現しないコントロールのAd. CMV-LacZの感染をした場合、EGFPの可視レベルの発現はなく問題となるバックグラウンドはなかった。またAd. CA-Creを感染させた後のPCMV-loxP-Neo-EGFPとpCA-loxP-Neo-EGFPがそれぞれ安定導入されたES細胞のEGFPの発現レベルは、いずれにおいてもpCA-loxP-Neo-EGFPの方が強かった。これは多くの細胞株で報告されてきたのと同様に、ES細胞においてもCMVプロモーターよりCAプロモーターの方が強発現を誘導できるという、それぞれのプロモーター活性の違いによると思われる。しかしpCMV-loxP-Neo-EGFPが導入されたES細胞でも可視レベルのEGFPの発現が得られ、さらに感度がいいセルソーターでの解析と単離を目的とした実験にはpCMV-loxP-Neo-EGFPでも本質的には問題ないと考えられる。本実験例での以下の分化誘導の実験には、より発現が強く蛍光顕微鏡下での観察がより明確に解析がより容易に行えるという点で、pCA-loxP-Neo-EGFPを用いて行った。

前述のように、pCA-loxP-Neo-EGFPが安定導入されCre酵素の発現後にloxPで挟まれたNeo遺伝子が切り出されてEGFPの強発現が保証された15クローンのES細胞のうち、3個のクローンを用いてAd. Nkx2.5-Creを用いた分化誘導の実験を行った。前述のAd. CA-Creを用いた予備実験で、Ad. CA-Cre感染1日後より十分に可視化されるレベルのEGFPの発現がみられ、感染2日後で最大の発現レベルに達し、それ以降同レベルのEGFPの持続発現が得られることが確認された。

比較例で既に述べた、embryoid bodyを介した分化誘導系にこの3クローンのES細胞を使用してみた。まず、この分化誘導系でのNkx2.5 mRNAの発現をRT-PCRで毎日調べたところ、分化誘導5日目よりNkx2.5の発現が明らかにみられた。このため分化誘導後4日目に分化中のES細胞にAd. Nkx2.5-Creを30 MOIで感染させた。つまり、1日にLIF非添加のES細胞用培地で培養し非接着状態でembryoid bodyの作成を初め、分化誘導開始後3日目に培養皿に接着させ、4日目にAd. Nkx2.5-Creを30 MOIで感染さ

せた。分化誘導開始後5日目より蛍光顕微鏡下で所々にEGFPが可視化で
きる細胞が出現し、分化誘導開始後6日目より蛍光顕微鏡下で非常に強
い発現レベルのEGFP発現が観察され、このEGFPの発現は以降もずっと見
られた（第4図C参照）。6日目、あるいは8日目でトリプシンにより細
5 胞塊をばらばらにし、一個ずつの細胞に十分分離した後、セルソーター
にてEGFPを発現する目的細胞を単離した。このフローサイトメトリーの
解析では、Ad. Nkx2.5-Creを感染させた群の陽性率、つまりNkx2.5発現
細胞は約2%であった（第5図参照）。一方これに対し、陽性コントロール
としてAd. Nkx2.5-Creの代わりにAd. CA-Creを感染させた群での陽性率
10 は（則ちこれはアデノウイルスが感染しCre遺伝子を導入した細胞の割
合を表すものである）、約60%であった（第5図参照）。また一方陰性コ
ントロールとしてAd. Nkx2.5-Creの代わりにAd. CMV-LacZを感染させた
群、あるいはアデノウイルスベクターを全く感染させなかった群での陽
性率は（則ちこれはpCA-loxP-Neo-EGFPの遺伝子が安定導入されているE
15 S細胞での、Cre酵素によるloxPが切りだされていない状態でのEGFP発現
の漏れ、バックグラウンド）0-0.2%であった（第4図a、第5図参照）。

すなわちこの実験系では、非常に高率に約60%の細胞に正しく目的の
遺伝子が導入されており、またバックグラウンドがなく、正しく目的の
Nkx2.5発現細胞を可視化し、さらに単離できるということで、従来不可
20 能だったこれらの技術を解決した非常にすぐれた実験系であることが分
かった。

次いで、単離された細胞はすぐに培養皿に蒔いて培養し、翌日、ある
いは数日後にその細胞の性格、形質について解析を行った。まず単離さ
れた細胞のEGFP遺伝子の発現は、翌日から数日後も、大部分の細胞にお
25 いて蛍光顕微鏡ではっきりと確認できるくらいの強いEGFPの発現を示
していた。これにより、この方法で単離された細胞が非常に高純度で目的
の細胞であることが分かった。次に細胞の性格、形質の解析のため、こ

の細胞からRNAを抽出しRT-PCR法により、Nkx2.5遺伝子の発現、心筋特異的な分子、並びにその他関連の遺伝子の発現を調べた。あるいは、これらの単離細胞の免疫細胞染色を行い、これらの分子の発現を調べた。

まずNkx2.5遺伝子、 α MHC、MEF2c（心筋特異的転写因子）、GATA4（心筋に頻度が高く発現する転写因子）は、80%の細胞で明らかな発現がみられた。この結果よりこの細胞の多くは心筋細胞であることが分かった。

一方、20-30%の細胞に、心筋以外のマーカーの平滑筋型アクチン（smooth muscle actin: SMA）、トロポミオシン（tropomyosin: TM）の発現もみられた（第6図a参照）。ES細胞からNkx2.5を発現する細胞のみを確実に（しかも蛍光顕微鏡でも可視化できるレベルで確実に）単離できた報告はこれまでになく、Nkx2.5は現在まで分かっている心筋特異的遺伝子の中で心筋の発生過程で最も早期に発現する転写因子であることを考えると、本細胞の一部が心筋以外のマーカーを発現するという結果は、本細胞が今までにES細胞から単離されたことのない、成熟心筋細胞以前の分化段階の心筋細胞、さらには心筋芽細胞とでもいべき心筋への分化が運命付けられているより未分化な細胞の可能性もある。そのため、この単離された細胞自身が、特に未だ十分に解明されていない初期の心臓の発生や、分化、再生に関する今後の基礎研究、ES細胞を使った心疾患への再生医療法開発にいて非常に有用なものと考えられる。

また、心筋の各分化段階で発現する様々な心筋特異的遺伝子はMEF2CやGATA4など幾つか報告されており、今後本方法を用いることでこのような遺伝子の発現を指標に心筋の各分化段階の細胞を自由に単離することが可能であり、本法の発明の意義は大きい。さらに本法の有用性は心筋に限定されるものではなく、組織特異的、あるいは性格が同定された種々遺伝子のプロモーターを用いれば、ES細胞から分化するいかなる特異的な分化段階の各組織も、ある遺伝子の発現に特化したいかなる目的の細胞も可視化でき、単離することが可能である。この点から、本発明

は、ES細胞を用いた再生医学、発生学において極めて重要な意義を持つものである。

〔実施例 2〕

- 本発明に用いる第 2 のプロモーターは、Nkx2.5 遺伝子プロモーターに限られるものではなく、その他の心筋特異的遺伝子を指標にした ES 細胞由来の心筋細胞、あるいは ES 細胞由来の他の細胞や組織を蛍光顕微鏡下で可視化し、さらに単離する目的で一般化することに広く用いることが可能である。つまり第 2 のプロモーターさえ目的のものに置換する事で、いかなる ES 細胞由来の目的細胞をも可視化し単離できる。このような本
- 10 発明の広い一般的な有用性をさらに確認するために、第 2 のプロモーターにマウスの α MHC 遺伝子プロモーターを用いたアデノウイルスベクター Ad. α MHC-Cre、つまりこれは α MHC が発現する心筋細胞に特異的に Cre 酵素を発現するような組換え遺伝子を導入するアデノウイルスベクターであるが、これを実施例 1 と同様の方法で作成して同様の実験を行った。
- 15 Ad. α MHC-Cre は以下のようにして作成した。まずシンシナチー医科大学 (University of Cincinnati, College of Medicine) の Jeffrey Robbins 氏より供与された、 α MHC プロモーターが挿入されているプラスミド (プラスミドの詳細は、J. Biol. Chem. Vol. 266, p9180-9185 (1991) に記載) から、BamHI と SalI で α MHC 遺伝子プロモーターを含む約 5.
- 20 5kb の DNA を切り出し、T4 DNA ポリメラーゼ I で末端を平滑化し、精製、抽出した。これは Robbins 氏らが上記文献で報告しているように、心臓型 β ミオシン重鎖遺伝子の 3' 側の最後のエクソンの一部、 α MHC の 3' 領域ならびに蛋白をコードしない最初の三つのエクソンを含む DNA であり、この領域が心臓特異的な発現をもたらすプロモーターとして働く
- 25 ことが同論文で示されている。一方実施例 1 で作成したベクターの pHM Δ p-Cre を NotI 酵素で切断し、T4 DNA ポリメラーゼ I で末端を平滑化し、CIP 酵素で末端脱リン酸化処理して精製した。これを前述の α MHC 遺伝子

プロモーターの5.5kbのDNA断片とともに、T4 DNAリガーゼ酵素で反応させライゲーション反応を行い、 α MHC遺伝子プロモーターの下流にCre遺伝子が繋がれたプラスミッドpHM- α MHC-Creを作成した。このpHM- α MHC-CreとアデノウイルスベクタープラスミッドpAdHM4を実施例1で記載した
5 ように、制限酵素のI-CeuI、PI-SceIで切断した後、両プラスミッドをT4 DNAリガーゼでライゲーションすることにより、pAdHM4- α MHC-Creを得た。pAdHM4- α MHC-CreをPacIで切断し精製したものを293細胞に遺伝子導入し、10-14日後に出現したアデノウイルスAd. α MHC-Creのブランクを回収し、実施例1に記載したものと同様にウイルス増幅、精製、脱塩
10 をおこなった。このように作成されたAd. α MHC-Creは、細胞に感染、遺伝子導入後は、 α MHC遺伝子プロモーターの制御下にCre遺伝子を発現するものである。

実施例1で作成したpCA-loxP-Neo-EGFPが安定導入されたES細胞クローン株の中で、Creの発現後にEGFPが強く発現することが確認されたES細胞クローン株を用いて、Ad. Nkx2.5-Creの代わりにAd. α MHC-Creを用いて実施例1と同様の実験を行った。基本的な実験プロトコール、手技は実施例1に記載したのと同じであるが、ただ実施例1では、Ad. Nkx2.5-Creを分化誘導後4日目に感染させて6日目に可視化された目的細胞をセルソーターで単離させていたところを、本実施例ではAd. α MHC-Creを
20 9日目に感染させて13日目に可視化された目的細胞をセルソーターで単離することにした。これは分化誘導開始後のES細胞の内因性の α MHC遺伝子の発現をRT-PCR法や免疫組織化学で調べたところ、 α MHCの発現は約8日目から14日目にかけて顕著にみられたためである。ES細胞の分化におけるこの α MHCの発現時期の結果は、 α MHCは心筋特異的収縮蛋白の一つであるため成熟した心筋細胞で発現が強くみられるという生体内での事実と一致するものであり、また心筋様の拍動を示すES細胞のコロニーも分化誘導後9-14日目に最も顕著にみられるということもこれと合致

する所見である。このようにAd. α MHC-Creの感染の時期以外の点では、実施例1と全く同じように以下の実験を行った。

- Ad. α MHC-Cre感染後1日目（分化誘導後9日目）より、一部の細胞にEGFPの発現が蛍光顕微鏡下で認められ、感染後2日目（分化誘導後10日目）からはっきりとし、それ以降発現はやや増強し、感染後4日目（分化誘導後13日目）にはEGFPの発現は最大となったため、この時にトリプシンで細胞をばらばらにし、セルソーターでEGFP陽性細胞を単離した（第4図d参照）。単離された細胞はほとんどEGFPを発現していた。さらにこれらの細胞の特性を確認するために、RT-PCRと免疫染色により、
- 10 α MHC、アクチニンなどの心筋特異的分子のmRNAと蛋白の発現を調べたところ、単離されたほとんどの細胞でこれらの心筋特異的分子の発現は陽性であった（第6図b参照）。さらに、電子顕微鏡の観察で横紋筋繊維構造などの心筋細胞に特有な細胞構造も確認できた。そして何と云っても、培養皿に接着させて培養して翌日から数日間、細胞の心筋様の拍動
- 15 が観察されたことは、単離された細胞が目的の成熟した心筋細胞であることを示している。これらの結果より、単離された細胞は成熟した心筋細胞であることが確認できた。このように本法により、Nkx2.5は転写因子で α MHCは収縮蛋白というように、二つの性格の異なる遺伝子のプロモーターを用いて、実施例1で比較的未熟な分化段階の心筋細胞を、そして実施例2で成熟した心筋細胞を、確実に単離できたことから、本発明が広く一般化して用いられ、有用であることが確認された。
- 20

〔実施例3〕

- 実施例1では第1の組換えDNAが安定導入できたES細胞クローンを最初に取り、そのES細胞に分化誘導過程で第2の組換えDNAをアデノウイルスベクターにより遺伝子導入するという方法を用いたが、実施例
- 25 3ではES細胞クローンを取るといった作業をすることなしに、第1の組換えDNAも第2の組換えDNAも分化誘導過程のES細胞にアデノウイ

ルスベクターを使って直接遺伝子導入した。

このためまず、第1の組換えDNAを遺伝子導入できるアデノウイルスベクターを以下のように作製した。

- まず実施例1で作成したpCA-loxP-Neo-EGFP、pCMV-loxP-Neo-EGFPから
- 5 SalI酵素処理により、5'側よりCAプロモーター、リコンビナーゼ認識配列のloxP配列で囲まれたneo遺伝子、ポリA配列、EGFP遺伝子、ポリA配列が繋がった目的のDNA断片を切り出した。一方、アデノウイルスを作成するシャトルベクターのpHM5プラスミド（Mark Kay氏より供与：プラスミドの詳細はH. Mizuguchi and M. Kay: Human Gene Ther vol.
- 10 10: 2013-2017 (1999)に記載、マルチクロニングサイトの両端にそれぞれI-CeuIとPI-SceIの制限酵素認識配列を有する）は、マルチクロニングサイトのSalI認識配列をSalI酵素で切断し、CIP酵素で末端脱リン酸化処理し、これと上記の切り出された目的のDNA断片とを、T4 DNAリガーゼ酵素でライゲーションすることにより、目的の第1の組換えDNA
- 15 N Aが挿入されたシャトルベクタープラスミッドpHM-CA-loxP-Neo-EGFP、pHM-pCMV-loxP-Neo-EGFPを各々得た。さらに、このpHM-CA-loxP-Neo-EGFP、pHM-pCMV-loxP-Neo-EGFPからI-CeuI、PI-SceI酵素で目的の遺伝子部分を切り出し、実施例1でも述べたように、I-CeuI、PI-SceI酵素処理されたアデノウイルスベクタープラスミドのpAdHM4とともに、T4
- 20 DNAリガーゼでライゲーションすることで、目的の第1の組換えDNAを持つアデノウイルスベクタープラスミッドpAdHM4-CA-loxP-Neo-EGFP、pAdHM4-pCMV-loxP-Neo-EGFPを各々作成した。

- アデノウイルスベクターの作成は実施例1で述べたように行った。つまり、pAdHM4-CA-loxP-Neo-EGFP、pAdHM4-pCMV-loxP-Neo-EGFPをPacI酵
- 25 素処理後に293細胞にトランスフェクションし、得られたウイルスブランクを増幅、精製、脱塩して、目的の第1の組換えDNAを含むアデノウイルスベクターAd.CA-loxP-Neo-EGFP、Ad.CMV-loxP-Neo-EGFPを得た。

実施例1でも述べたように、本実施例の目的には、CAプロモーターでもCMVプロモーターでも本質的な差はないが、より発現が強いということと以下には、Ad. CA-loxP-Neo-EGFPを用いた実験結果を示す。但し、Ad. CMV-loxP-Neo-EGFPでも同様の実験を行い、同様の結果が得られることは確認されている。

全く遺伝子が導入されていないES細胞(D3)を用い、実施例1と同様に、LIFを除いた培地でembryoid bodyを作成することで分化誘導を行った。

まずNkx2.5を指標とした、ES細胞由来のより未分化な心筋細胞の単離には、4日目にAd. Nkx2.5-CreとAd. CA-loxP-Neo-EGFPの2つのアデノウイルスベクターをそれぞれ30 MOIで感染させ、6日目にセルソーターで目的のEGFP発現細胞を単離した。つまり本実施例が実施例1と異なるのは第1の組換えDNAをアデノウイルスベクターを使って遺伝子導入したことのみにある。この実験の結果、実施例1と同様の細胞が単離され、これらの細胞は実施例1と同様の遺伝子の発現パターンを示した。

次に α MHC遺伝子を発現するES細胞由来の成熟心筋細胞の単離には、実施例2と同様に分化誘導第9日目に、Ad. α MHC-CreとAd. CA-loxP-Neo-EGFPの2つのアデノウイルスベクターをそれぞれ30 MOIで感染させ、第13日目にセルソーターで目的のEGFP発現細胞を単離した。この実験結果も、実験2と同様の細胞が単離され、これらの細胞は同様の心筋特徴的な遺伝子の発現パターンや心筋細胞様の収縮を示した。

この2つの実験結果より、第1の組換えDNAも第2の組換えDNAもアデノウイルスを使って遺伝子導入することで、従来の遺伝子導入安定発現細胞を取って行う方法と同様の結果が、より簡単に得られることが確認できた。

実施例1及び実施例2で示したように、従来の技術で第1の組換えDNAを安定発現するES細胞を作成し、良好なクローンを選んでおいて、これに第2の組換えDNAをアデノウイルスで遺伝子導入するという方

法と、実施例 3 のように両方の DNA をアデノウイルスを使って遺伝子導入する方法は、いずれも本発明における意義において本質的な差はない一方、それぞれの利点は目的によって使い分けが有用と考えられる。

5 二つの DNA の遺伝子導入にアデノウイルスベクターを用いる利点をまとめると以下のようになる。

(1) 第 1、第 2 の組換え DNA が安定導入され恒常発現するクローン
を取る煩わしい作業の労力、時間を必要としない：つまり実施例 1、2
で示したように、従来の方法で第 1 の組換え DNA を導入し安定的に恒
常発現するクローンを選んで取るには、労力も時間も必要とする。さら
10 に全くアデノウイルスベクターを使用せず従来技術だけで遺伝子導入
して、第 1 と第 2 の組換え DNA の両方を安定的に恒常発現するクロー
ンを選んで取るとすると、さらなる時間と労力を要することになる。こ
の場合それに加え、2 種類の異なる薬剤耐性遺伝子を必要とすること
なり、これらの多重薬剤耐性遺伝子発現、またそのクローンを選択する
15 煩雑な作業や長期の薬剤使用による ES 細胞への影響、つまり細胞の性格
の変化など、問題となる可能性があり、またこのような種々の影響で目
的のクローンがとれない場合さえもある。

(2) アデノウイルスベクターは分化段階の任意な時期に高率に簡単に
目的遺伝子を導入できる：これは従来技術では不可能なことであつた
20 が、アデノウイルスを使えば簡単にできることを、本発明で示した。こ
の利点として、(1) で記載したこととも関連するが、ES 細胞に不要な
遺伝子や薬剤の長期間の暴露などの、不要な影響を与えない。

(3) アデノウイルスベクターは、宿主細胞（この場合 ES 細胞）に導入
遺伝子を episomal（染色体に組み込まれることなく核内に存在）の形で
25 安定して長期間発現させるため、安定した結果が得られる：従来の方
法で、染色体に目的の遺伝子が組み込まれた ES 細胞クローンを薬剤耐性遺
伝子を利用して取って来る方法の場合、これらの導入遺伝子が染色体に

ランダムに組み込まれるため染色体上で組み込まれた場所の影響、クロマチン構造の影響などを受ける。このため必ずしも組み込まれた遺伝子が全て安定して発現するわけではないため、(1)に記載したように導入遺伝子を安定発現する良好なクローンを選択してくるのに時間と労力を要する。さらにES細胞では、他の癌細胞株や初代正常培養細胞などを用いた場合に比べ、染色体に組み込まれた導入遺伝子の発現が不安定になりやすいこと、例えば導入遺伝子の発現がシャットオフされる場合もあることが知られている。これに対しアデノウイルスベクターで遺伝子を導入した場合、episomalであるため、このような染色体やクロマチンの影響をうけにくく、安定した発現が得られ、再現性のある安定した結果がいつも得られる。

(4) 任意のES細胞株を用いることができる：ES細胞株の種類、またそのクローンやサブクローンによって分化能、性格が異なっている。この場合、ある細胞の単離には、よりその細胞へ分化しやすいことが同定されているES細胞株のクローンを特に指定して使用したい場合が考えられる。実施例3の第1と第2の組換えDNAを遺伝子導入できるアデノウイルスベクターを用いれば、それぞれのES細胞株やクローンについて安定細胞株を作成する必要がなく、自由に望みのES細胞を使用して行うことができる。

(5) ES細胞以外にも簡単に遺伝子導入できるため、作成した第1の組換えDNAの特異性を他の細胞で直接的に確認することができる。また他の細胞での実験へも、この遺伝子構築したものが簡単に応用できる。

〔実施例4〕

前述したように、実施例で使用したNkx2.5遺伝子プロモーター及び α MHC遺伝子プロモーターの特異性は既に確認されており、また実際の実験結果でも心筋細胞を単離できることは明らかとなったが、さらに上記の(5)の観点から、実施例3の二つのアデノウイルスで導入したDN

Aが正しく目的の心筋細胞を特異的に可視化できていることを直接的に証明する目的で、この二つのアデノウイルスをマウスの初代心筋培養細胞に感染させてみた。

出生1日目の新生児マウスより心筋を取り出し、これをコラゲナーゼ
5 で消化して心筋細胞を単一細胞に分離した後、培養皿に巻いて培養した。

この初代心筋細胞培養の手技は、Khalid MA et al. *Circ. Res.* 72, p725-736 (1993)、ならびにWang L et al. *Circ. Res.* 79, p79-85 (1996) に記載された方法に基本的に従って行った。このように培養して2
10 日目の心筋細胞に、Ad. Nkx2.5-CreとAd. CA-loxP-Neo-EGFPをそれぞれ
5MOIで感染させて、感染72時間後に蛍光顕微鏡下で観察したところ、遺伝子が導入された心筋細胞がEGFP陽性として可視された。同様のプロトコールで、Ad. α MHC-CreとAd. CA-loxP-Neo-EGFPを同じように感染させても、遺伝子導入された心筋細胞はEGFP陽性として可視された。これらの二つのアデノウイルスベクターを他の心筋以外の数種類の培養細胞
15 (Helaヒト子宮頸癌細胞、MKN28ヒト胃癌細胞、LL2マウス肺癌細胞、LM8マウス骨肉腫細胞など)に感染させて、その特異性を検証したが、いずれの細胞でもこのようなEGFPの発現は蛍光顕微鏡でみられなかった。このように実施例1、2、3で用いた第1の組換えDNAと第2の組換えDNAは、遺伝子導入されると明らかに心筋細胞のみを標的化して
20 EGFPで可視化できていることが直接的に証明された。

また、恒常的強発現プロモーターのCAプロモーター及び組織特異的遺伝子のNkx2.5プロモーターと α MHCプロモーターのプロモーター活性を調べるための実験を行った。すなわち、以下のアデノウイルスベクターを感染効率(MOI)30か500で感染させたマウス初代培養心筋細胞と
25 NIH3T3マウス線維芽細胞株を用いてウエスタンブロット解析(Cre抗体)を行った(図7参照)。CAはAd. CA-Creを感染させ5 μ gの蛋白を泳動、CA'はAd. CA-Creを感染させ0.5 μ gの蛋白を泳動、CA''はAd. CA-Creを感

5 染させ0.1 μ gの蛋白を泳動、NCは陰性コントロールでno Ad, 5 μ gの蛋白を泳動、Nkx2.5はAd.Nkx2.5-Creを感染させ5 μ gの蛋白を泳動、 α MHCはAd. α MHC-Creを感染させ5 μ gの蛋白を泳動、Tublin（心筋細胞や線維芽細胞で分泌される蛋白）は内因性のコントロールとして、抗Tublin抗体を用いて検出した。図7から、CAプロモーターは5 μ gの蛋白を用いる場合は勿論のこと、10倍希釈したCA'と50倍希釈したCA''でもリコンビナーゼCreが検出されているが、Nkx2.5プロモーターと α MHCプロモーターはいずれも5 μ gの蛋白でも非常に微量が検出されに過ぎなかった。これにより、組織特異的遺伝子のNkx2.5プロモーターと α MHCプロモーター
10 のプロモーター活性は非常に弱く、本発明によってのみ、EGFPなどの選択マーカーを発現させられることが分かる。

産業上の利用分野

本発明の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法は、単離される各種の細胞、組織を用いて、発生学、再生医学、その他の分子生物学的研究に広く有用であるだけでなく、これらの目的細胞を用いた、心筋梗塞、脳梗塞を初めとする種々の難治性疾患への将来の再生医療の開発にも非常に有用である。また、永続的、恒常的に分化した目的細胞から更に分化した細胞をも標識して可視化できるので、分化系統、組織系統が培養皿上で観察、解析することが可能となる。胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的な単離又は可視化は、単離又は可視化用キットを用いることにより一層簡便に行うことができる。

本発明は、発明の実質的範囲に包含される限り、上記の実施例に制限されるものではない。

請求の範囲

1. 第1のプロモーター、リコンビナーゼ認識配列を両端に有する遺伝子、胚性幹細胞から分化する目的細胞の選択マーカー遺伝子の順に5'側
5 から配置され、第1のプロモーターが前記選択マーカー遺伝子を発現させる第1の組換えDNAと、胚性幹細胞から分化する目的細胞に対して特異的に発現する第2のプロモーター、リコンビナーゼ発現遺伝子の順に5'側から配置された第2の組換えDNAとを、各々胚性幹細胞に導入することを特徴とする胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。
10
2. リコンビナーゼ認識配列が、loxPである請求の範囲第1項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。
3. 第1のプロモーターが、恒常的強発現プロモーターである請求の範囲第1項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可
15 視化方法。
4. 恒常的強発現プロモーターが、CMVプロモーター又はCAプロモーターである請求の範囲第3項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。
5. 選択マーカー遺伝子が、蛍光蛋白遺伝子である請求の範囲第1項に
20 記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。
6. リコンビナーゼ発現遺伝子が、リコンビナーゼCre発現遺伝子である請求の範囲第1項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。
7. 第2のプロモーターが、Nkx2.5遺伝子プロモーター又は α MHC遺伝
25 子プロモーターである請求の範囲第1項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。
8. 第1の組換えDNAの胚性幹細胞への導入が、第1の遺伝子導入用

ベクターを用いて行われることを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。

9. 第 1 の遺伝子導入用ベクターが、ウイルスベクターである請求の範囲第 8 項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。

10. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求の範囲第 9 項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。

11. 第 2 の組換え DNA の胚性幹細胞への導入が、第 2 の遺伝子導入用ベクターを用いて行われることを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。

12. 第 2 の遺伝子導入用ベクターが、ウイルスベクターである請求の範囲第 11 項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。

13. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求の範囲第 12 項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。

14. 請求の範囲第 1 項に記載の第 1 の組換え DNA が導入された胚性幹細胞。

15. 請求の範囲第 1 項に記載の第 2 の組換え DNA が導入された胚性幹細胞。

16. 請求の範囲第 1 項に記載の第 1 の組換え DNA と第 2 の組換え DNA とが各々導入された胚性幹細胞。

17. 胚性幹細胞が、マウスに由来する請求の範囲項 14 ～ 請求項 16 のいずれかに記載の胚性幹細胞。

18. 請求の範囲第 8 項に記載の第 1 の組換え DNA を含む第 1 の遺伝子導入用ベクター。

19. ウイルスベクターである請求の範囲第18項に記載の第1の遺伝子導入用ベクター。
20. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求の範囲第19項に記載の第1の遺伝子導入用ベクター。
- 5 21. 請求の範囲第11項に記載の第2の組換えDNAを含む第2の遺伝子導入用ベクター。
22. ウイルスベクターである請求の範囲第21項に記載の第2の遺伝子導入用ベクター。
23. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求の範囲
- 10 第22項に記載の第2の遺伝子導入用ベクター。
24. 請求の範囲第18項に記載の第1の遺伝子導入用ベクターと、請求の範囲第21項に記載の第2の遺伝子導入用ベクターとを備えた胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。
- 15 25. 第1の遺伝子導入用ベクターと第2の遺伝子導入用ベクターがウイルスベクターである請求の範囲第24項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。
26. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求の範囲
- 20 第25項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。
27. 請求の範囲第14項に記載の胚性幹細胞と、請求の範囲第21項に記載の第2の遺伝子導入用ベクターとを備えた胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キッ
- 25 ト。
28. 第2の遺伝子導入用ベクターがウイルスベクターである請求の範囲第27項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は

可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。

29. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求の範囲第28項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。

- 5 30. 請求の範囲第18項に記載の第1の遺伝子導入用ベクターと、請求の範囲第15項に記載の胚性幹細胞とを備えた胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。

31. 第1の遺伝子導入用ベクターがウイルスベクターである請求の範囲第30項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。

32. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求の範囲第31項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。

- 15 33. 請求の範囲第1項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法により得られる細胞。

34. 細胞が、第2のプロモーターとしてNkx2.5遺伝子プロモーターを用いて得られる細胞である請求項33記載の細胞。

35. 細胞が、第2のプロモーターとして α MHC遺伝子プロモーターを用いて得られる心筋細胞である請求の範囲第33項に記載の細胞。

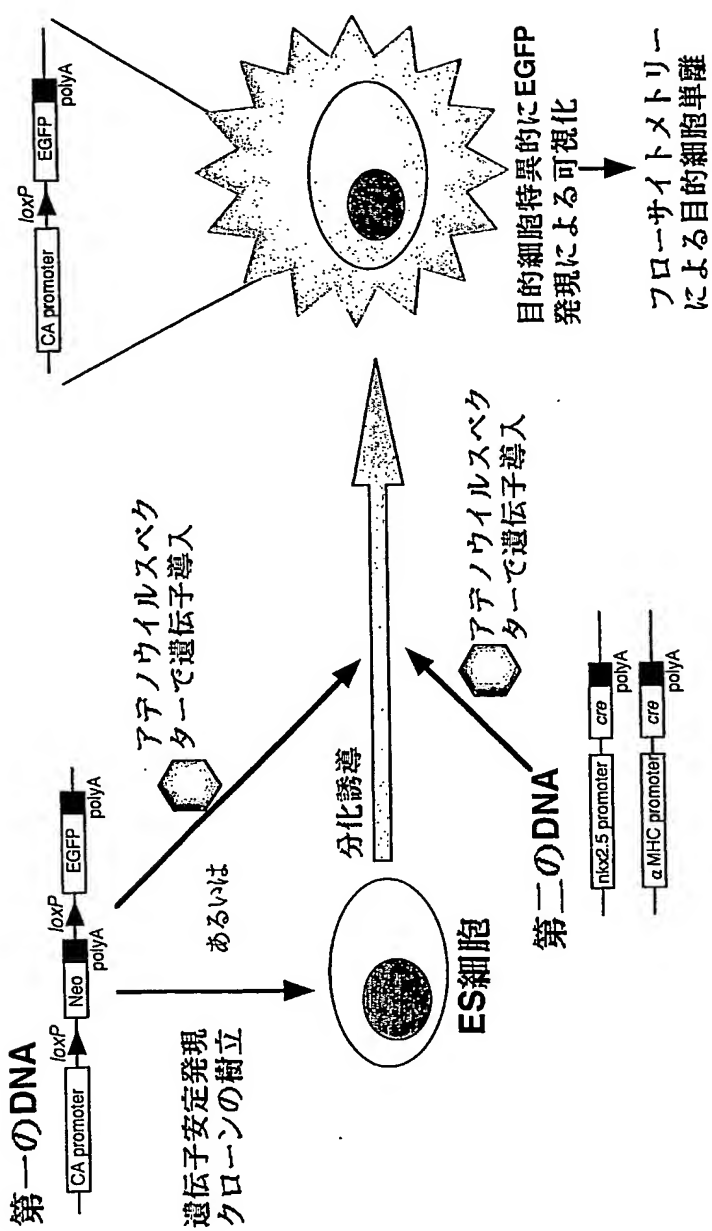
36. 請求の範囲第33項に記載の細胞を含む組織。

37. 請求の範囲第33項に記載の細胞及び／又請求の範囲第36項に記載の組織を用いる疾患の治療法。

38. 疾患が、心疾患である請求の範囲第37項に記載の疾患の治療法。

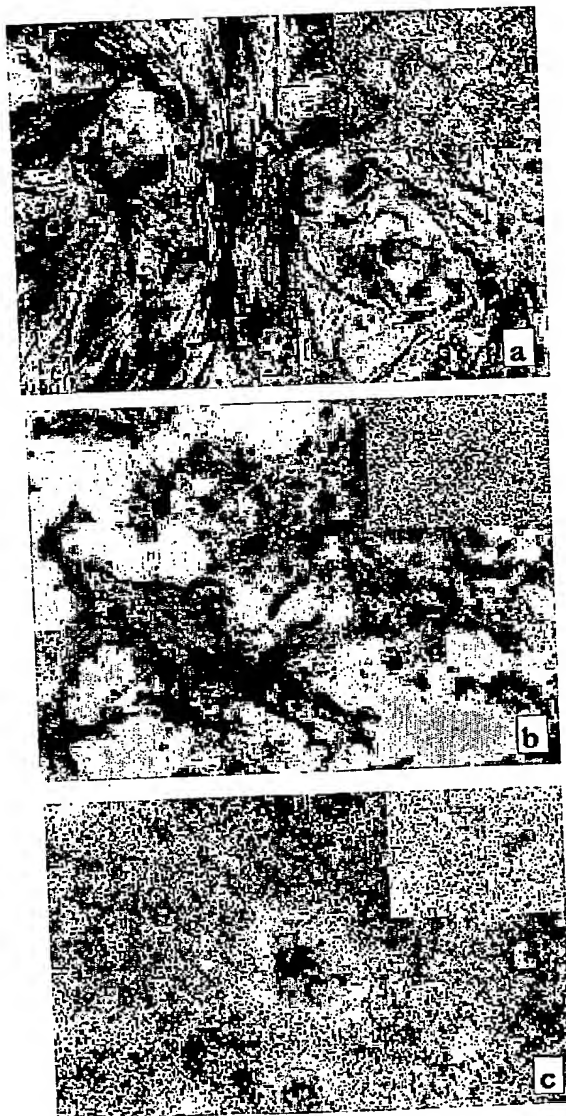
1 / 5

第1図

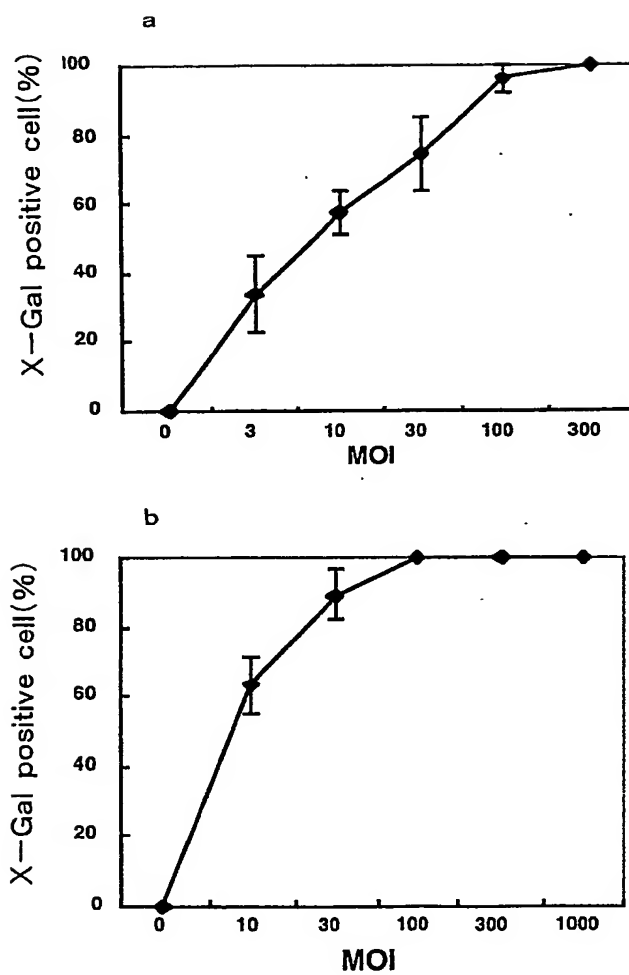


2 / 5

第2図

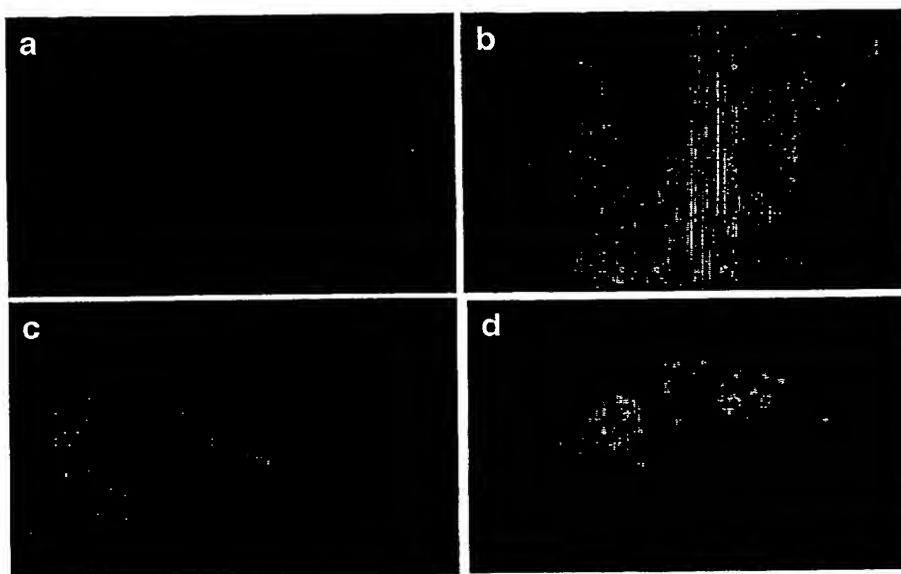


第3図

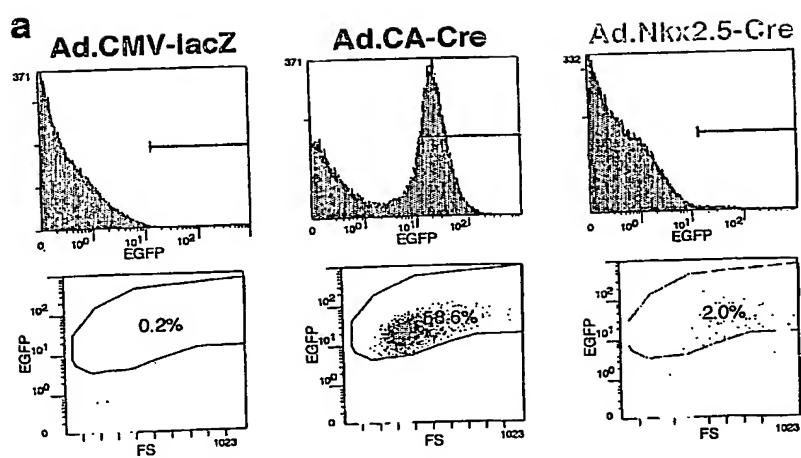


4 / 5

第4図

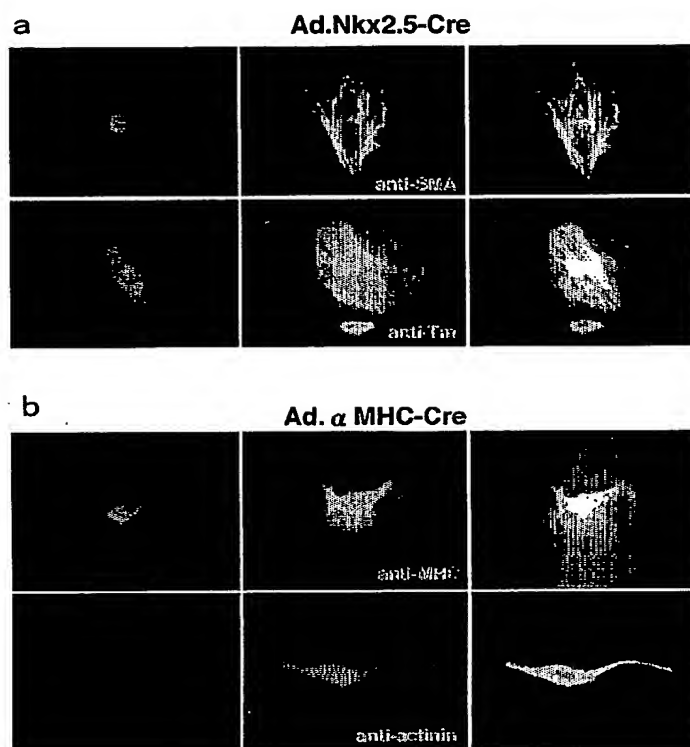


第5図

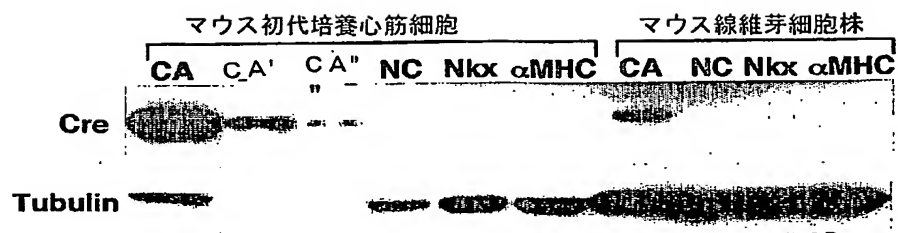


5 / 5

第6図



第7図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07536

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, 5/06, C12Q1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00, 5/06, C12Q1/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kimi ARAKI et al., "Efficiency of Recombination by Cre Transient Expression in Embryonic Stem Cells: Comparison of Various Promoters", The Journal of Biochemistry, 1997, Vol.122(5), pages 977 to 982, full text	1-36
X	Ludovic Vallier et al., "An efficient system for conditional gene expression in embryonic stem cells and in their in vitro and in vivo differentiated derivatives", Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 2001, Vol.98(5), pages 2467 to 2472, full text	14, 18-20, 33-36
X	EP 704534 A2 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 03 April, 1996 (03.04.96), Claims; examples & JP 8-84589 A & US 5717492 A	21-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
16 September, 2003 (16.09.03)Date of mailing of the international search report
30 September, 2003 (30.09.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07536

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Christian Andressen et al., "Nestin-Specific Green Fluorescent Protein Expression in Embryonic Stem Cell-Derived Neural Precursor Stem Cells, 2001, Vol.19, pages 419 to 424, full text	33, 36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07536

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 37-38

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 37 to 38 pertain to methods for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00, 5/06, C12Q1/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00, 5/06, C12Q1/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Kimi Araki et al. "Efficiency of Recombination by Cre Transient Expression in Embryonic Stem Cells: Comparison of Various Promoters" The Journal of Biochemistry, 1997, Vol.122(5), p.977-982, 文献全体参照	1-36
X	Ludovic Vallier et al. "An efficient system for conditional gene expression in embryonic stem cells and in their in vitro and in vivo differentiated derivatives" Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 2001, Vol.98(5), p.2467-2472, 文献全体参照	14, 18-20, 33-36

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.09.03

国際調査報告の発送日

30.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

4N

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 704534 A2 (Sumitomo Pharmaceuticals Company, Limited) 1996.04.03, 特許請求の範囲及び実施例等参照, & JP 8-84589 A & US 5717492 A	21-23
X	Christian Andressen et al. "Nestin-Specific Green Fluorescent Protein Expression in Embryonic Stem Cell-Derived Neural Precursor Cells Used for Transplantation" Stem Cells, 2001, Vol.19, p.419-424, 文献全体参照	33, 36

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 37-38 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項37-38は、治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定によりこの国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.